

**Bestimmung der löslichen Fibrinmonomer-Komplexe
im Plasma
mittels Adsorptionschromatografie und Gelfiltration
- ein Methodenvergleich -**

Thomas Melcher

1981

Aus der 1. Frauenklinik und Hebammenschule der Universität München

Direktor: Prof. Dr. J. Zander

Bestimmung der löslichen Fibrinmonomer-Komplexe

im Plasma

mittels Adsorptionschromatografie und Gelfiltration

- ein Methodenvergleich -

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Thomas Melcher

aus

Regensburg

1981

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Graeff

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J. Zander

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1981



Gewidmet: Meinen lieben Eltern

Margarethe und Gottfried Melcher



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549025_0087

Inhaltsübersicht

A. Einleitung

B. Material und Methoden

1. Auswahl der Patientinnen
2. Zur Gewinnung des Plasmas
3. Hämatokritbestimmung
4. Fibrinogenbestimmung
5. β -Alanin-Fällung von Fibrinogen und seinen Derivaten
6. Agarose-Gelfiltration
7. Berechnung des relativen und absoluten Gehalts von LFMK im Plasma
8. Adsorptionschromatografie
9. Staphylokokken-Clumping-Test
10. Statistische Auswertungsmethoden

C. Ergebnisse

D. Diskussion

1. Diskrepanz zwischen den LFMK-Konzentrationen, gemessen mit Adsorptionschromatografie und Gelfiltration
2. Selektivität und Spezifität der Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie als Trennmethode für LFMK

Inhaltsübersicht - Forts. -

- a) Agarose-Gelfiltration
- b) Selektivität und Spezifität der Adsorptions-
chromatografie
- 3. Genauigkeit der quantitativen Bestimmungsmethoden
 - a) Planimetrie
 - b) Staphylokokken-Clumping-Test
- 4. Temperaturabhängigkeit bei Adsorptionschromatografie
und Gelfiltration
- 5. Auftreten von Fibrinpolymeren mit hohem Molekulargewicht
- 6. Schlußbemerkung
- E. Zusammenfassung
- D. Literatur

A. Einleitung

Thromboembolische Erkrankungen und intravasale Gerinnung treten gehäuft während der Schwangerschaft, im Wochenbett und in der postoperativen Phase auf.

Eine Diagnose dieser Erkrankungen ist derzeit nur anhand der klinischen Symptomatik möglich, das heißt, erst nach der Manifestation einer Thrombose oder Embolie. Die Aktivierung des Gerinnungssystems befindet sich dann bereits in einem sehr fortgeschrittenen Stadium, die Therapie gestaltet sich deshalb sehr schwierig und führt nicht immer zum gewünschten Erfolg.

Ein Ziel der Gerinnungsforschung ist die Erfassung des Stadiums der Hyperkoagulabilität durch Bestimmung von Laborparametern des Blutplasmas, um bereits ehe es zu klinischen Symptomen kommt, vorbeugend therapeutisch tätig werden zu können.

Charakteristisch für den Zustand der gesteigerten Gerinnungsbereitschaft ist eine erhöhte Konzentration von thrombin-induzierten Umsatzprodukten des Fibrinogens im Blutplasma. Dazu gehören Fibrinogen-Fibrin-Dimere (LFMK), lösliche Fibrinpolymere, Fibrinmonomere (Des-A-Fibrin) und das Fibrinopeptid A. Durch Einwirkung von Thrombin (Faktor II a) auf Fibrinogen werden die Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogenmolekül abgespalten und es entsteht das Fibrinmonomer. Dieses kann sich wieder mit einem Fibrinogenmolekül verbinden unter Bildung

eines Fibrinogen-Fibrin-Dimers oder sog. löslichen Fibrinmonomer-Komplexes (LFMK). Reagieren mehrere Fibrinmonomere miteinander, so entsteht zunächst ein Fibrinpolymer; diese verbinden sich weiter zum Fibringerinnsel, das durch die Wirkung von Faktor XIIIa stabilisiert wird. Fibrinpolymer und LFMK sind unter physiologischen Bedingungen im Plasma löslich, erst die Fibrinpolymere einer bestimmten Länge und in einer bestimmten Konzentration bilden einen Niederschlag, der jedoch im Harnstoff reversibel ist. Die Einwirkung von Faktor XIIIa macht die Reaktion irreversibel und führt zum unauflöslichen Fibrinnetz.

Ältere Methoden zur Erfassung der löslichen Fibrinderivate im Plasma sind die Kryopräzipitation (4, 23), die Protaminsulfatfällung (23) und der Äthanol-Test (8). Diese Verfahren sprechen jedoch auf geringe Konzentrationen von löslichen Fibrinderivaten nicht an und sind für quantitative Bestimmungen nicht geeignet.

Einen großen Fortschritt bei der Isolierung von Fibrinogen und seiner Umsatzprodukte aus den übrigen Plasmaproteinen stellte die Entwicklung der Agarose-Gelfiltration (6) und der Adsorptionschromatografie mit agarose-fixiertem Fibrinogen, bzw. Fibrinmonomer dar (18). Beide Methoden isolieren die LFMK quantitativ aus dem Blutplasma.

Bei der Agarose-Gelfiltration werden zunächst Fibrinogen und seine Derivate mittels β -Alanin-Fällung aus dem Plasma angereichert und dann filtriert. Dabei werden die verbliebenen Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht getrennt und in Fraktionen eluiert. Auf diese Weise werden die LFMK vom Fibrinogen separiert (9). Durch fortlaufende Messung der optischen Dichte des Eluats wird eine Extinktionskurve aufgezeichnet, bei der die LFMK als eine Schulter vor dem Fibrinogen-Peak auftreten. Die quantitative Bestimmung der LFMK erfolgt mittels Planimetrie.

Bei der Adsorptionschromatografie werden die Chromatografie-Säulen mit agarose-fixiertem Fibrinogen bestückt und mit unbehandeltem Plasma beschickt. Sind LFMK im Plasma vorhanden, so dissoziieren sie in der Säule im Verhältnis 1 : 1 (21) in Fibrinmonomer und Fibrinogen. Das Fibrinmonomer wird an das fixierte Fibrinogen adsorbiert und der Fibrinogenbestandteil des LFMK wird eluiert. Durch Änderung von Molarität und pH des Säulenmilieus werden nun die adsorbierten Fibrinmonomere eluiert und können jetzt quantifiziert werden. Die quantitative Bestimmung erfolgte mittels des Staphylokokken-Clumping-Tests. Grundlage dieses Tests ist eine hochempfindliche Verklumpungsreaktion der Staphylokokken-Oberflächenantigene in Anwesenheit von Fibrinogen und seinen Derivaten.

Aufgabe dieser Studie war es nun, die qualitative und quantitative Bestimmung der LFMK im Blutplasma einerseits mittels Agarose-Gelfiltration und andererseits mit der Methode der Adsorptionschromatografie, einer vergleichenden Untersuchung zu unterziehen.

Zu diesem Zweck wurden Plasmaproben von Patientinnen unmittelbar vor der Geburt, nach der Geburt und im Wochenbett abgenommen, die LFMK-Bestimmung wurde mit jeweils beiden Methoden durchgeführt und die Ergebnisse mit den statistischen Analysen von Varianz und Regression verglichen.

B. Material und Methoden

1. Auswahl der Patientinnen

Das untersuchte Plasma stammte von 48 Patientinnen, die zwischen dem 1.11.1975 und 31.3.1976 an der I. Frauenklinik der Universität München mit sectio caesarea entbunden wurden. Die Auswahl beschränkte sich vor allem auf die Kaiserschnitt-Patientinnen, weil hier ein erhöhter LFMK-Spiegel zu erwarten war, der für eine Bestimmung der LFMK-Konzentration unerlässlich ist.

Ein Teil der Patientinnen wurde ab Operationsbeginn bis zum 7. Tag nach der Operation prophylaktisch mit niedrig dosiertem Heparin behandelt (10 000E Calciparin/Tag). In dieser Studie wird zwischen heparinisierten und nicht heparinisierten Patienten nicht unterschieden, zumal eine Beeinflussung der Obergerinnbarkeit bei dieser Medikation nicht festgestellt werden konnte (4).

2. Gewinnung des Plasmas

Unmittelbar vor der Operation sowie am Morgen des zweiten und sechsten Tages nach der Operation wurden aus der Ku-

bitalvene 9 ml Blut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte unter leichter, gleichmäßiger Aspiration mittels Einmal-kanülen (0,80 x 32 mm) und 10 ml Einmalspritzen. In den Spritzen war 1 ml Antikoagulanzlösung, bestehend aus 0,13 M Trinatriumcitrat, 0,06 TES (Tris-(hydroxymethyl)-methyl-2-amino-äthan-sulfonsäure), 0,05 M EDTA, 1000 KIE Trasylol/ml vorgelegt.

Sodann wurde das Blut bei 3000U/min 15 min lang zentrifugiert und das Plasma abpipettiert. Dieses wurde nochmals 20 min bei 5000U/min zentrifugiert, um die Thrombozyten und Leukozyten zu eliminieren. Nach der Probeentnahme für die Fibrinogenbestimmung wurde das Plasma mit 50 USP-E Heparin (Liquemin, Hoffmann-La Roche, Grenzach) pro 5 ml Plasma versetzt. Die Plasmaproben wurden bei -25°C maximal neun Monate aufbewahrt.

3. Hämatokritbestimmung

Der Hämatokrit wurde mit Antikoagulans-versetztem Blut bestimmt. Verwendet wurden Micro-Hämatokrit-Tubes (Clay Adams, Parsipanny, N.Y., USA). Da bei der Blutabnahme 9 ml Blut mit 1 ml Antikoagulantienlösung verdünnt wurde, mußte der abgelesene Hämatokrit-Wert mit dem Korrekturfaktor 1,111 multipliziert werden. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt.

4. Fibrinogenbestimmung

Die Fibrinogenbestimmung erfolgte nach Blombäck und Blombäck (2).

0,5 ml Plasma werden mit 2,5 ml Phosphatpuffer (0,01M, 0,15M NaCl, pH 6,35) und 0,15 ml Thrombinlösung (4,5 NIH-E Test-Thrombin, ORHT, Behringwerke, Marburg) versetzt und sofort kräftig durchgemischt. Nach zwei Stunden wurde das Fibringerinnsel mit einem Glashäkchen entnommen, auf einem Nylogewebe synärisiert, dreimal mit 0,15 M NaCl-Lösung gewaschen und in verschraubbares Glasröhrchen mit 10 ml 40%-iger Harnstofflösung (0,2 M an NaOH) überführt. Nach Zusatz von 1 ml 0,3 M Kochsalzlösung wurde nach vollständiger Lyse des Gerinnsels die optische Dichte in einer 1 cm dicken Quarzküvette bei 280 und 325 nm gegen eine Blindlösung gemessen (Spektralphotometer Hitachi 181). Die Berechnung erfolgte nach der Formel: $\text{mg Fibrinogen/ml} = \Delta E_{280-325\text{nm}} \times 6,927 \times 2$. Der Faktor 6,927 errechnet sich aus dem Extinktionskoeffizienten für Fibrinogen in Alkali von 15,87 ($\Delta E_{1\text{cm}}^{1\%}$) nach Hörmann und Gollwitzer.

Die Fibrinogenwerte wurden um die Antikoagulantienverdünnung korrigiert, wobei entsprechend den Überlegungen von Sehlighsohn und Mitarbeitern (37) nach folgender Formel der Hämatokrit

mitberücksichtigt wurde: mg% Fibrinogen (korr.) =

mg% Fibrinogen $\times \frac{100-HK}{(100-HK)-10}$, wobei HK für nichtkorrigierten Hämatokrit steht.

Die Fibrinogenbestimmungen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Berechnung der Präzision in der Serie ergab für die Methode einen Variationskoeffizienten von 1,8 %.

5. β -Alanin-Fällung von Fibrinogen und seinen Derivaten

(Nach Straughn und Wagner (34), modifiziert nach Graeff und v. Hugo (14, 9)).

Zu den 2,5 ml Plasma werden unter langsamem Rühren im Eiswasserbad innerhalb von 10 min 3 ml 40%-ige Alaninlösung zugetropft (Endkonzentration 2,5 M).

Nach weiteren 10 min Rühren wird der Niederschlag bei 2000 g (5 min, 4°C) abzentrifugiert, der Oberstand verworfen und das verbleibende Präzipitat unter Rühren bei Raumtemperatur in 1 ml TES-Trasylo1-Citrat-Puffer (pH 7,5) gelöst. Eine eventuell verbleibende Trübung wird durch Zentrifugieren bei Raumtemperatur mit einer Tischzentrifuge (Hettich EBA III) entfernt. (TES-Trasylo1-Citrat-Puffer pH 7,5: 0,06 M TES, 0,08 M NaCl, 0,0129 M Tri-Na-Citrat, 100 KIE Trasylo1 pro ml).

6. Agarose-Gelfiltration

Die Gelfiltration erfolgte an 4%-iger Agarose (Biogel A-15 M, 100-200 mesh, Bio-Rad Lab., München). Der Protein-gehalt der Proben wurde photometrisch bestimmt, um durch Auftragen ähnlicher Konzentrationen vergleichbare Werte zu erhalten. Die Proben, die 5-8 g Protein enthielten, wurden auf die Säulen (1,5 x 80 cm) aufgetragen und mit Tris-Cl-Citrat-Puffer, pH 7,6, eluiert. Die Durchflußrate im freien Fall betrug 13 ml/h. Das Eluat wurde automatisch in Einzelfraktionen zu je 3 ml aufgefangen. Nach Beendigung des Laufs wurde die optische Dichte der Fraktionen mit einem Spektralphotometer Hitachi 181 bei 280 und 325 nm gemessen und die Differenz für jede Fraktion auf Millimeterpapier aufgetragen. (Tris-Cl-Citrat-Puffer, pH 7,6: 0,05 M Tris, 0,11 M NaCl, 0,0129 M Tri-Na-Citrat, 0,2 M E-Aminocapron-säure (EACA), 0,025 Na-Azid mit HCl auf pH 7,6 eingestellt)

7. Berechnung des relativen und absoluten Gehalts von LFMK im Plasma

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die LFMK in einer Schulter vor dem Fibrinogen-Peak eluiert werden (9), zwischem dem Ausschlußvolumen und dem aufstei-

genden Schenkel des Fibrinogen-Peaks. Dabei handelt es sich hauptsächlich um eine Komponente, die in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese bei pH 8,6 eine Beweglichkeit von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vxs}$ besitzt und aufgrund ihres Wanderungsverhaltens wahrscheinlich ein Dimer des Fibrinogens (Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplex) darstellt. Daneben werden auch noch Banden mit höherem Teilchengewicht festgestellt, bei denen es sich wahrscheinlich um Fibrinoligomere handelt (11). Dieser Teil des Elutionsvolumens wurde planimetriert und mit der Fläche des Fibrinogen-Peaks verglichen. Das Planimetrieren erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Kurvenabschnitte und Auswiegen der Papierabschnitte auf der Analysenwaage. Der Gehalt an LFMK, ausgedrückt in Prozentanteilen des Fibrinogen-Peaks errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Prozent LFMK} = \frac{A}{A+B} + 100$$

A und B sind die jeweiligen Kurvenabschnitte (siehe Abb.5 S. 37) und werden mit der Benennung Milligramm in die Formel eingesetzt.

Der absolute Gehalt an LFMK, ausgedrückt in mg/100 ml Plasma errechnet sich wie folgt:

$$\text{LFMK (mg/100 ml Plasma)} = \frac{\text{LFMK\%} \times \text{Fibrinogen (mg/100 ml)}}{100}$$

8. Adsorptionschromatografie

Als Adsorptionssubstanz wurde Fibrinogen verwendet, das an

das Polysaccharid Sepharose 6B gekoppelt wurde.

Das Humanfibrinogen stammte von der Deutschen Kabi GmbH (München) und wurde bis zum Stadium I-4 nach dem Verfahren von Blombäck und Blombäck (2) gereinigt. Dadurch wurde eine Gerinnbarkeit von 94 - 96 % erreicht. Das Fibrinogen wurde an CNBr-aktivierte Sepharose 6B (Deutsche Pharmacia, Frankfurt/Main) gekoppelt, nach dem Verfahren von Axén und Ernback (1). Bei +4°C wurde eine Chromatographiesäule (0,8 x 18 cm) mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Perpex, LKB, Schweden) mit dem gekoppelten Material bis zu 12 cm aufgefüllt. Als Durchflußgeschwindigkeit wurden 18 ml/h gewählt, und die optische Dichte des Eluats wurde bei 281 nm fortlaufend gemessen (Uvicord II, LKB). Nun wurden 3,0 ml Plasma zugeführt, und daraufhin das nicht adsorbierte Protein mit Puffer A (0,05 M Tris-Phosphat, 0,1 M NaCl, 0,1 M EACA, pH 7,6) ausgewaschen, bis die Basislinie der Pufferextinktion erreicht war. Das adsorbierte Protein wurde mit Puffer B (0,05 M Tris-Phosphat, 1,0 M KBr, 0,1 M EACA, pH 5,3) eluiert. Für den folgenden Versuch wurden zehn 2ml-Spritzen mit Fibrinogen-Sepharose bis zur 4cm-Marke aufgefüllt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 7 ml/h (Desaga, PLK, Mehrkanalpumpe). Am Ende jeden Laufs wurden die Säulen 30 min lang mit Puffer B gespült, um denaturiertes Protein zu entfernen, und die Haltbarkeit der Fibrinogen-Sepharose zu erhöhen. In dem Milieu

von Puffer B ist kein Bakterienwachstum möglich (pH 5,3, 1,0 M KBr) und die Haltbarkeit der Säulen ist in diesem Milieu wesentlich besser, als in dem Milieu von Puffer A. Zu Beginn jeden Adsorptionslaufs wurden alle Säulen mit Puffer A 60 min lang gespült, um die für die Adsorptionsreaktion günstigen Werte für pH und Konzentration zu erreichen (pH 7,6, 0,1 M NaCl).

Sodann wurde bei jeder Säule 1,0 ml Plasma aufgetragen und daraufhin drei Stunden lang mit Puffer A gespült, um die Fibrinmonomere an das fixierte Fibrinogen zu adsorbieren und die anderen Proteine, die im Plasma enthalten sind, auszuwaschen.

Die LFMK bestehen aus Molekülen, deren Molekulargewicht höher ist als das von Fibrinogen. Bei Untersuchungen der LFMK mittels Gel-Elektrophorese in 5%-igem PAA-Gel zeigen sie eine elektrophoretische Beweglichkeit von $0,28 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vxs}$, während Fibrinogen eine Beweglichkeit von $0,43 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vxs}$ aufweist (21). In dem Milieu von Puffer A findet in der Säule eine Gleichgewichtsreaktion statt zwischen den LFMK und dem Agarose-fixierten Fibrinogen. Die LFMK dissoziieren im Verhältnis von annähernd 1 : 1 in einen Teil, der adsorbiert wird und einen, der mit Puffer A wieder ausgewaschen wird (21). Ersteres ist als Fibrinmonomer zu betrachten,

letzteres ist der Fibrinogenbestandteil des LFMK.

Nach dem Pufferwechsel zu Puffer B dissoziiert der Komplex aus Agarose-fixiertem Fibrinogen und Fibrinmonomer und die Fibrinmonomere erscheinen im Eluat. Zwanzig Minuten nach Beginn des Pufferwechsels wurde mit der fraktionierten Sammlung des Eluats begonnen. Zu diesem Zweck wurde ein, von A. Stemberger konstruiertes Fraktioniergerät benutzt. Dieser Apparat besteht im wesentlichen aus einem Plexiglasblock, der mit 5 Löchern versehen ist, in denen die Chromatografie-Säulen gehalten werden. Diese Säulenhaltung wird von einem Elektromotor mittels Schraubenwendel angetrieben; in waagrechter Richtung ist ein Gewinde in den Block gebohrt, in dem sich die Schraubenwendel dreht und so die Säulenhaltung mit konstanter Geschwindigkeit über die Auffangvorrichtung für das Eluat bewegt. Die Auffangvorrichtung besteht aus zwei aufeinandergeschraubten Plexiglasplatten, deren 50 Löcher in 5 Reihen zu je 10 Löchern angeordnet sind. Das Eluat tropft durch konische Löcher, deren Ränder in einer Reihe unmittelbar aneinander stoßen, in Eppendorf-Küvetten (Inhalt pro Küvette 0,25 ml). Nach einem Durchlauf wurde der pH-Wert des Eluats in den Küvetten mittels Lackmuspapier bestimmt. Bei dem Inhalt der Küvetten, deren pH-Wert bei 6,0 lag und der jeweils

drei davor liegenden Küvetten wurde die LFMK-Konzentration mittels Staphylokokken-Clumping-Test bestimmt.

Nach jeweils 10 Läufen wurde ein Kontrolllauf für die Säulen eingelegt, um festzustellen, ob bereits fixiertes Fibrinogen eluiert wird. Zu diesem Zweck wurde statt Patientenplasma normales Plasma für die Adsorptionschromatografie verwendet. Nach Heene und Matthias (1973) (18) wird bei Adsorptionschromatografie von normalem Plasma nach dem Pufferwechsel kein fibrinogenähnliches Material eluiert. Positiver Staphylokokken-Clumping-Test wurde als Anzeichen gewertet, daß Säulen-Fibrinogen im Eluat erscheint, das heißt, die Sepharose-Fibrinogen-Bindung wird instabil. Die entsprechende Chromatografie-Säule wurde mit frischem Sepharose-fixiertem Fibrinogen gefüllt und nach nochmaliger Kontrolle, bei negativem Staphylokokken-Clumping-Test, der Versuch fortgesetzt.

Zu Beginn der Versuchsreihe fanden die Chromatografie-Läufe bei einer Raumtemperatur von 25 - 30°C statt. Bei diesen Temperaturen ließen sich mit dem Staphylokokken-Clumping-Test keine Fibrinogen-ähnlichen Substanzen im Eluat nachweisen, obwohl bei vorhergehenden Untersuchungen derselben Plasmaproben mithilfe der Agarose-Gelfiltration bei ca. 20°C Raumtemperatur Fibrinmonomere nachgewiesen werden konnten.

Bei einer Versuchstemperatur von +40°C konnten auch mittels der Adsorptionschromatografie Fibrinmonomere nachgewiesen werden. Die ausgewerteten Versuchsläufe fanden fortan bei +40°C statt.

9. Staphylokokken-Clumping-Test

Der Staphylokokkus aureus D₂C trägt an seiner Zelloberfläche den Clumping-Faktor, einen hitzebeständigen, in einem weiten pH-Bereich stabilen Peptidkomplex. Die Verklumpungsfähigkeit bleibt auch nach zehn-minütiger Erhitzung auf 56°C und in den pH-Grenzen zwischen 5,1 und 10,0 erhalten (17). Bei Erhitzung auf 60°C über 10 Minuten geht die Verklumpungsfähigkeit verloren. Durch 0,01 M Na-Citrat wird die Verklumpungsreaktion nicht beeinträchtigt. Befindet sich allerdings Heparin im Vollblut oder Plasma, aus dem das zu bestimmende Serum hergestellt wird, so zeigt sich ein erhöhter Verklumpungstiter, da das Fibrinogen unvollständig koagulierte und somit noch reagibles Fibrinogen im Serum enthalten ist. Die Verklumpungsreaktion tritt ein, bei Anwesenheit von Fibrinogen, Fibrinmonomeren und der Fibrinogen- bzw. Fibrinspaltprodukte X und Y in der Staphylokokkensuspension. Mit den reinen Spaltprodukten D und E reagiert der Clumping-

Faktor nicht.

Der Staphylokokken-Clumping-Test wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Der Inhalt der vier Küvetten vor dem pH-Umschlag zum sauren Milieu, in dem die eluierten Fibrinmonomere enthalten sind, wird vereinigt und gemischt. 50 µL davon werden auf eine Mikrotiterplatte übertragen und mit Tris-Puffer (pH 7,4, aus FSP-Testbesteck Behring) in einer Verdünnungsreihe jeweils im Verhältnis 1 : 2 verdünnt. Von jeder Probe wurden fünf Verdünnungsschritte hergestellt, was sich in jedem Fall als ausreichend erwies. Sodann wurde jeweils ein Tropfen (0,25 µl) Staphylokokkensuspension (FSP-Testbesteck Behring) zugegeben und nach fünfminütigem Schütteln wurde vor einem dunklen Hintergrund die Verklumpung abgelesen. Die Nachweisgrenze des Staphylokokkenansatzes für Fibrinogen-Abbauprodukte wurde mittels Verdünnungsreihe einer standardisierten Fibrinogenlösung ermittelt. Sie lag bei 25 µg/ml Fibrinogen. Folglich entsprach eine positive Verklumpungsreaktion des ersten Verdünnungsschrittes einer LFMK-Konzentration in Serum von 2,25 µg% und eine positive Reaktion der weiteren Verdünnungsstufen den LFMK-Konzentrationen 4,5 µg%, 9,0 µg%, 18,0 µg% und 36,0 µg%.

10. Statistische Auswertungsmethoden

Die Zusammenhänge zwischen den gemessenen Werten wurden durch die statistischen Verfahren der Regressionsanalyse und der Varianzanalyse ermittelt.

Mittels Streuungsdiagramm und Regressionsanalyse wurde die Straffheit des Zusammenhangs untersucht zwischen den LFMK-I-Werten, die mit Agarose-Gelfiltration bestimmt worden waren und den LFMK-II-Werten, die mit Adsorptionschromatografie gemessen worden waren. Durch den Korrelationskoeffizienten wird die Eindeutigkeit der Zuordnung ausgedrückt. Er kann Werte zwischen 0 und ± 1 annehmen. Ist der Korrelationskoeffizient gleich ± 1 , so ist eine eindeutige lineare Zuordnung der beiden Wertereihen möglich; ist er gleich Null, so ist keinerlei Zuordnung möglich und die Werte sind nach dem Zufall verteilt.

Im Streuungsdiagramm werden die gemessenen Werte als Punkte in ein Koordinatensystem eingetragen und eine Gerade wird so durch die Punktwolke gelegt, daß die Summe der vertikalen bzw. waagrechten Abstände der Punkte von der Geraden minimal wird. Die Auswertung mittels Streuungsdiagramm und Regressionsanalyse erfolgte für die Wertereihen, die präoperativ (A), am zweiten postoperativen Tag (B) und am sechsten postoperativen Tag (C) gewonnen worden waren jeweils getrennt. Der

Regressionskoeffizient wird folgendermaßen berechnet:

$$\hat{y} = bx + a$$

b: Regressionskoeff.

$$b = S_{xy} / S_{xx}$$

S_{xy} : Summe der Abweichungsprodukte

x_j, y_j : Koordinaten eines gemessenen Punktes

$$S_{xy} = \sum_j (x_j - \bar{x})(y_j - \bar{y})$$

$$S_{xx} = \sum_j (x_j - \bar{x})^2$$

$\bar{x}, \bar{y}$: Koordinaten eines Punktes auf der Regressionsgerade

S_{xx} : Summe der Abweichungsquadrate (SAQ)

Der Varianzanalyse wurden diejenigen 15 Fälle unterzogen, für die alle drei Werte A, B, C vollständig vorlagen. Mit dieser Methode können mehrere Mittelwerte simultan verglichen werden. In diesem Fall wurden zwei Fragestellungen untersucht:

- a) Gehören die zu den jeweiligen Zeitpunkten A, B und C gemessenen Werte derselben Grundgesamtheit an?

Hier wurden die durch Agarose-Gelfiltration einerseits und durch Adsorptionschromatografie andererseits erhaltenen Meßreihen getrennt nach A, B und C verglichen.

Nullhypothese: Die zu den Zeiten A, B und C mittel Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie gemessenen Werte gehören zu derselben Grundgesamtheit.

Alternativhypothese: Die zu den Zeiten A, B und C mittels Agarose-Gelfiltration gemessenen Werte gehören zu einer anderen Grundgesamtheit, als die mit Adsorptionschromatografie bestimmten.

- b) Ist der intraindividuelle zeitliche Verlauf der, mit Agarose-Gelfiltration gemessenen Werte mit dem zeitlichen Verlauf der Adsorptionschromatografie-Werte identisch?

Zur statistischen Bearbeitung dieser Fragestellung wurden die Differenzen zwischen den Meßwerten zum Zeitpunkt A und zum Zeitpunkt B, sowie diejenigen zwischen B und C der Varianzanalyse unterzogen.

Nullhypothese: Der zeitliche Verlauf der LFMK-I-Werte entspricht dem der LFMK-II-Werte.

Alternativhypothese: Der zeitliche Verlauf der LFMK-I-Werte gehört statistisch zu einer anderen Grundgesamtheit als der Verlauf der LFMK-II-Werte.

Alle statistischen Aussagen wurden auf dem 1%-Irrtumsniveau getroffen ($p = 0,01$).

Die Berechnung des F-Tests erfolgte gemäß der allgemein verwendeten Formeln (35).

C. Ergebnisse

Insgesamt wurden 81 Plasmaproben sowohl mit Agarose-Gelfiltration als auch mittels Adsorptionschromatografie untersucht. Davon wurden 31 Proben vor der Operation gewonnen (Gruppe A) und 23 am zweiten Tag nach der Operation (Gruppe B) und 27 am sechsten Tag nach der Operation (Gruppe C). Die durch Agarose-Gelfiltration erhaltenen Werte werden im folgenden als LFMK-I-Werte bezeichnet, die durch Adsorptionschromatografie bestimmten als LFMK-II-Werte. Die gewonnenen Daten wurden jeweils getrennt nach den Gruppen A, B und C statistisch aufbereitet.

Die Betrachtung der Ergebnisse zeigt folgendes Bild (siehe Tabelle 1 S. 21):

Die LFMK-II-Werte sind in der Gruppe A durchschnittlich um 45 % niedriger als die LFMK-I-Werte; in der Gruppe B sind die LFMK-II-Werte im Durchschnitt 62 % niedriger und in der Gruppe C um 54 % niedriger als die LFMK-I-Werte. Im gesamten Durchschnitt betragen die LFMK-II-Werte 46 % der LFMK-I-Werte. Die Varianz der LFMK-II-Werte liegt, verglichen mit dem Unterschied der durchschnittlichen Höhe zwischen LFMK-I-Werten und LFMK-II-Werten bei den LFMK-II-Werten wesentlich höher.

Mittels Regressionsanalyse wurde untersucht, ob ein gesetz-

mäßiger Zusammenhang besteht zwischen den Wertereihen, die mit Adsorptionschromatografie und denjenigen, die mit Agarose-Gelfiltration gemessen wurden. Die Regressionsanalyse wurde nach den Wertereihen A, B und C getrennt durchgeführt.

	A	B	C	Gesamt
Mittelwert AGF	5,1 %	4,2 %	4,5 %	4,6 %
Varianz	0,50	0,39	0,43	0,44
Mittelwert AC	2,8 %	1,6 %	2,1 %	2,1 %
Varianz	2,43	0,39	0,64	1,16
Unterschied zw. AGF und AC in %	54,8 %	37,6 %	45,8 %	46,1 %
größter Wert AGF	7,2 %	5,8 %	5,9 %	
kleinster Wert AGF	3,5 %	3,1 %	3,3 %	
größter Wert AC	5,0 %	3,5 %	4,5 %	
kleinster Wert AC	0,7 %	0,8 %	1,1 %	

Tabelle 1: LFMK-Konzentration in % der Fibrinogenkonzentration

AGF: Agarose-Gelfiltration

AC : Adsorptionschromatografie

A : Probe wurde präoperativ entnommen

B : Probe wurde am 2. postoperativen Tag entnommen

C : Probe wurde am 6. postoperativen Tag entnommen

Gesamt: Durchschnitt aus A, B und C

In der Gruppe A ergibt sich ein Korrelationskoeffizient von 0,287. Die Regressionsanalyse zeigt, daß es keinen statistisch gesicherten Zusammenhang zwischen LFMK-I-Werten und LFMK-II-Werten der Gruppe A gibt. Das Streuungsdiagramm der Gruppe A mit der Regressionsgeraden ist in Abbildung 2 S. 26 dargestellt.

Bei der Gruppe B beträgt der Korrelationskoeffizient zwischen LFMK-I-Werten und LFMK-II-Werten 0,184. Durch die Regressionsanalyse wurde festgestellt, daß statistisch kein Zusammenhang besteht zwischen den LFMK-Konzentrationen, die durch Agarose-Gelfiltration und denen, die durch Adsorptionschromatografie bestimmt wurden. Streuungsdiagramm mit Regressionsgeraden der Gruppe B ist in Abbildung 3 S. 27 zu sehen. Der Korrelationskoeffizient in der Gruppe C ergibt 0,194. Mit Hilfe der Regressionsanalyse kann statistisch kein gesicherter Zusammenhang zwischen den LFMK-I-Werten und den LFMK-II-Werten ermittelt werden. Streuungsdiagramm und Regressionsgerade der Gruppe C ist in Abbildung 4 S. 28 dargestellt.

Die Zusammenhänge zwischen den Wertereihen A, B und C wurden mit Hilfe der Varianzanalyse untersucht. Dabei ist insbesondere von Interesse, inwieweit ein statistischer Zusammenhang besteht zwischen den zeitlichen Mittelwerten.

A, B und C der beiden Meßmethoden und ob der zeitliche Verlauf der drei Mittelwerte übereinstimmt.

Die Varianzanalyse wurde mit den LFMK-Werten zu den Zeiten A, B und C von 15 zufällig ausgewählten Patienten durchgeführt. Die grafische Darstellung ist in Abbildung 1 S. 25 zu sehen.

Das Ergebnis der Varianzanalyse zeigt einen signifikanten Zeitfaktor, das heißt, die zeitlichen Mittelwerte, jeweils ermittelt durch Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie, gehören nicht zu derselben Grundgesamtheit.

Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs ergibt jedoch, daß dieser bei LFMK-I-Werten und LFMK-II-Werten identisch ist.

Insgesamt kann aus den Ergebnissen von Regressionsanalysen und Varianzanalysen geschlossen werden, daß eine der beiden Meßmethoden einen Faktor mißt, der starke individuelle Schwankungen aufweist und der von der anderen Methode nicht erfaßt wird. Bestätigt wird dieser Gedankengang vor allem dadurch, daß bei der Untersuchung der intraindividuellen Verläufe, bei der die interindividuellen Schwankungen nicht berücksichtigt werden, eine statistische Übereinstimmung der Resultate beider Methoden festgestellt wurde. Bei den anderen statistischen Auswertungsmethoden konnte keine Gesetzmäßigkeit

zwischen den durch Agarose-Gelfiltration ermittelten LFMK-I-Werten und den durch Adsorptionschromatografie erhaltenen LFMK-II-Werten eruiert werden.

Die Variationszahl ist bei den Bestimmungen der Adsorptionschromatografie deshalb relativ größer als bei den Bestimmungen der Agarose-Gelfiltration, weil die adsorbierten Fibrinmonomere durch den Staphylokokken-Clumping-Test in einer Verdünnungsreihe quantitativ bestimmt werden. Die Verdünnungsstufen erfolgten im Verhältnis von jeweils 1 : 2. Auf diese Weise entsteht ein relativ grobes Wertegeraster mit großen Abständen, in denen keine quantitative Differenzierung erfolgen konnte. Bei der Gelfiltration dagegen wird die LFMK-Konzentration durch Messung der optischen Dichte und anschließende Planimetrie bestimmt. Mit dieser Methode treten keine derartigen, durch die Meßtechnik bedingten Unschärfen auf.

Schließlich muß noch auf ein weiteres Resultat dieser Studie hingewiesen werden, das sich gewissermaßen im Nebenbefund ergab. Bei einer Raumtemperatur von ca. 30°C konnten nach Adsorptionschromatografie an sepharose-fixiertem Fibrinogen keine Fibrinmonomere im Eluat nachgewiesen werden. Die vorhergehende Untersuchung derselben Plasmen mittels Agarose-Gelfiltration bei ca. 20°C Raumtemperatur hatte jedoch ge-

zeigt, daß LFMK im Plasma vorhanden waren. Wurde die Adsorptionschromatografie bei einer Raumtemperatur von +4°C durchgeführt, so konnten LFMK im Plasma nachgewiesen werden. Aus diesem Sachverhalt kann man den Schluß ziehen, daß die Adsorptionsreaktion temperaturabhängig ist und das Reaktionsgleichgewicht bei höheren Temperaturen auf der Seite eines dissoziierten Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplexes liegt.

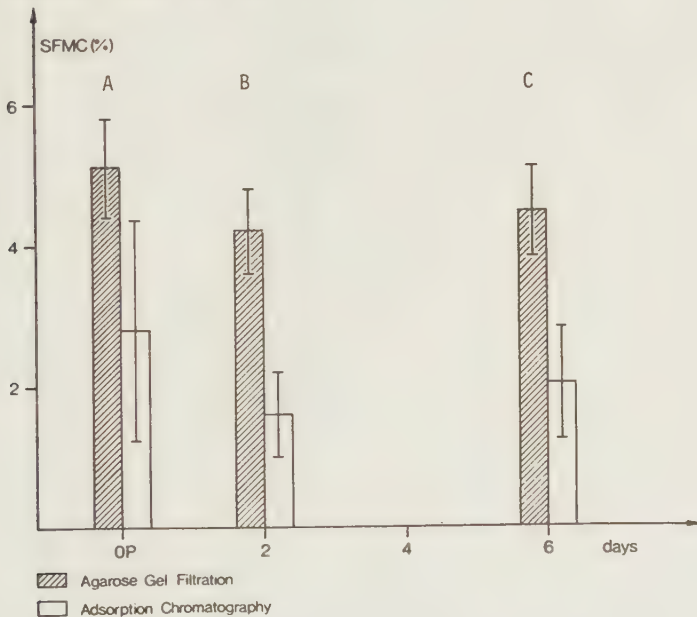


Abb. 1: Vergleichende Darstellung der durch Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie bestimmten Meßwerte.



Abb. 2: Streuungsdiagramm der Gruppe A

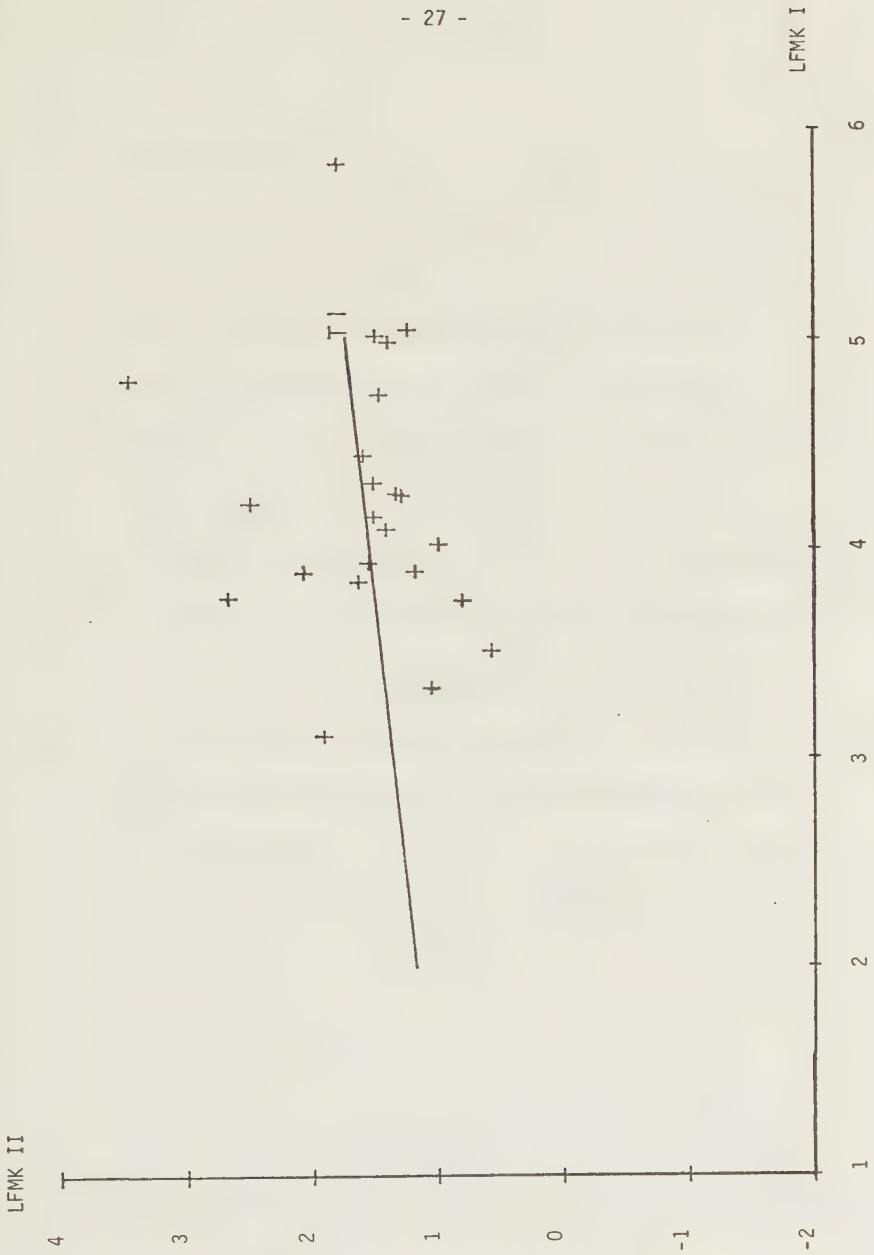


Abb. 3: Streuungsdiagramm der Gruppe B



Abb. 4: Streuungsdiagramm der Gruppe C

D. Diskussion

Im Rahmen der Diskussion sollen die in dieser Studie erarbeiteten Ergebnisse mit den bisher vorgelegten Forschungsergebnissen zum Problem der Bestimmung der LFMK im Blutplasma in Verbindung gebracht werden und die daraus entstehenden Probleme angesprochen werden. Dabei soll insbesondere auf folgende Probleme eingegangen werden:

1. Diskrepanz zwischen den LFMK-Konzentrationen, erhalten durch Adsorptionschromatografie und Agarose-Gelfiltration.
2. Selektivität und Spezifität von Gelfiltration und Adsorptionschromatografie als Trennmethoden für LFMK.
3. Genauigkeit der quantitativen Bestimmung durch Planimetrie und Staphylokokken-Clumping-Test im Vergleich.
4. Temperaturabhängigkeit bei Adsorptionschromatografie und Gelfiltration.
5. Auftreten von Fibrinpolymeren mit hohem Molekulargewicht.

1. Diskrepanz zwischen den LFMK-Konzentrationen, gemessen
mit Adsorptionschromatografie und Gelfiltration

Beim Vergleich von LFMK-I-Werten und LFMK-II-Werten fällt auf, daß die LFMK-II-Werte im Durchschnitt nur 46 % der Höhe der LFMK-I-Werte betragen. Zur Erklärung dieses Phänomens muß man sich die Zusammensetzung der LFMK und die Unterschiedlichkeit der Meßmethoden vergegenwärtigen. Bereits in früheren Arbeiten (22) wurde gefunden, daß die LFMK bei Adsorptionschromatografie im Verhältnis von annähernd 1 :1 dissoziieren. Demzufolge sind LFMK Dimere, die aus einem Molekül Fibrinogen und einem Fibrinmonomer zusammengesetzt sind. Fibrinmonomere entstehen durch Einwirkung von Thrombin auf Fibrinogen, wodurch das Fibrinopeptid A vom Fibrinogen abgespalten wird und Des-A-Fibrinmonomere polymerisieren und Komplexe bilden können (Blombäck et al. 1978)

(3). Sie haben daher ein geringeres Molekulargewicht (MG 321000) als Fibrinogen (MG 330000). Das Molekulargewicht des Fibrinmonomers beträgt demzufolge weniger als die Hälfte des Molekulargewichts eines LFMK (MG 651000).

Bei der Gelfiltration erscheinen die LFMK in der Vorschulter des Fibrinogen-Peaks (15) und werden in toto quantitativ bestimmt. Bei der Adsorptionsmethode dagegen werden

zunächst die Fibrinmonomere vom Fibrinogen getrennt und die Quantifizierung erfolgt mit den isolierten Fibrinmonomeren. Der Unterschied von durchschnittlich 54 % zwischen den LFMK-Konzentrationen, bestimmt durch Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie bei jeweils identischen Plasmaproben liegt zum größten Teil darin begründet, daß bei der ersten Methode die LFMK als Ganze gemessen werden, während bei der zweiten lediglich ein Bestandteil der LFMK, die Fibrinmonomere quantifiziert werden.

2. Selektivität und Spezifität der Agarose-Gelfiltration und Adsorptionschromatografie als Trennmethode für LFMK

Im folgenden soll dargestellt werden, inwieweit mit den Methoden der Agarose-Gelfiltration und der Adsorptionschromatografie an unlöslichem Fibrinogen alle LFMK einer Plasma- probe erfaßt werden und ob die LFMK mit ausreichender Schärfe von den anderen Plasmaproteinen getrennt werden.

a) Agarose-Gelfiltration

Zur Beurteilung von Selektivität und Spezifität der Gelfiltration werden die einzelnen Schritte der Plasmabehandlung

betrachtet und auf Quellen von Unschärfen hin untersucht. Vor der Durchführung der Gelfiltration werden Fibrinogen und LFMK durch β -Alanin-Fällung aus dem Plasma angereichert. Nach der Fällung findet man 60 - 80 % des im Plasma vorhandenen Fibrinogen-ähnlichen Materials in der Fällung wieder (15). 20 - 40 % werden mit dem Überstand verworfen. Dabei dürfte vor allem besser lösliches Fibrinogen im Überstand sein, während die schlechter löslichen Bestandteile, zu denen auch die LFMK zählen, zu einem größeren Anteil in der Fällung enthalten sind. Die quantitative Bestimmung der LFMK erfolgt nun dadurch, daß entsprechende Flächen unter der Extinktionkurve - für die LFMK die Fläche unter der Vorschulter und für Fibrinogen die Fläche unter dem Fibrinogen-Peak - ins Verhältnis gesetzt werden. Da jedoch relativ mehr Fibrinogen im Überstand verworfen wurde als LFMK, verschiebt sich das Verhältnis auf die Seite der LFMK und die so bestimmte LFMK-Konzentration ist tendenziell höher als die tatsächlich im Plasma vorhandene.

Zur weiteren Reinigung der Fibrinogen-ähnlichen Plasmabestandteile wird die Fällung mit Glyzin gewaschen und dann zentrifugiert. Dadurch verringert sich der Anteil der kontaminierenden Proteine von 20 - 30 % auf 3 - 5 % (15). Als nun noch verbleibende Verunreinigungen konnten lediglich

Immunglobulin G und Albumin nachgewiesen werden, die jedoch bei der Gelfiltration von Fibrinogen und seinen Derivaten getrennt und in einem späteren Peak eluiert werden (15). Sie beeinträchtigen deshalb die Bestimmung von Fibrinogen und LFMK nicht.

Wie bereits in einer früheren Studie gezeigt, werden die LFMK durch Agarose-Gelfiltration nicht vollständig von der Fibrinogenfraktion getrennt (21). LFMK werden sowohl in der Vorschulter, als auch im ansteigenden Schenkel des Fibrinogen-Peaks nachgewiesen. Dadurch entsteht ein Fehler bei der Bestimmung der Konzentration der LFMK. Dieser wird jedoch weitgehend ausgeglichen, da auch Fibrinogen in der Vorschulter-Fraktion eluiert wird (9, 11, 38).

Eine weitere Fehlerquelle ergibt sich möglicherweise aus der Retention von Fibrinogen-Derivaten in der Agarose-Säule. Von Krell und Mahn (18) wurde bei einer Studie mit radioaktiv markiertem Fibrin und Fibrinogen festgestellt, daß in Abhängigkeit von der Temperatur zwischen 50 % (bei 20°C) und 90 % (bei 37°C) des applizierten Fibrins in der Säule retiniert wurden. Eine andere Untersuchung von Hafter und v. Hugo (16) zeigt, daß fast 100 % des filtrierte Proteins im Eluat nachgewiesen werden können. Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie, bei der die LFMK-Werte sowohl durch Aga-

rose-Gelfiltration als auch durch Adsorptionschromatografie bestimmt wurden, kann geschlossen werden, daß bei dieser Versuchsreihe sicher nicht 50 % und mehr des applizierten Proteins in der Säule retiniert wurden.

b) Selektivität und Spezifität der Adsorptionschromatografie

Die Adsorptionschromatografie mit Agarose-fixiertem Fibrinogen wurde erstmals von Heene und Matthias durchgeführt (18). Damals konnte gezeigt werden, daß das Protein, das in Peak B eluiert wurde, die antigenen Eigenschaften des Fibrinogens hat und die Menge dieses Proteins in hoher Korrelation steht (Korrelationskoeffizient 0,9893) zu den, durch den Äthanol-Test bestimmten Fibrinogenderivaten. Bei Untersuchungen mit Humanplasma wurde sowohl Plasma von Gesunden als auch von Patienten mit disseminierter intravasaler Gerinnung der Adsorptionschromatografie unterzogen. Im ersten Fall wurde in Peak B fast kein Protein eluiert, während im zweiten Fall ein Fibrinogenderivat in Peak B nachgewiesen werden konnte.

Weitere Untersuchungen in Verbindung mit Polyacrylamidgel-Elektrophorese (21) zeigten, daß die LFMK während der Adsorptionschromatografie im Verhältnis von fast 1 : 1 dissoziieren in eine Komponente, die unter Puffer-I-Bedingungen

adsorbiert wird und eine, die nicht adsorbiert wird. Daraus kann man schließen, daß ein LFMK aus einem Molekül Fibrinogen besteht, das nicht an fixiertes Fibrinogen adsorbiert wird und aus einem Molekül Des-A-Fibrin (Fibrinmonomer), das adsorbiert wird (21).

Die Adsorptionschromatografie mit fixiertem Fibrinogen ist sehr spezifisch für LFMK. Es können in geringem Ausmaß jedoch auch andere Proteine im Milieu von Puffer I adsorbiert werden. So ist in der Literatur beschrieben, daß Kälte-unlösliches Globulin in Peak II eluiert wird, sofern Fibrinmonomere anwesend sind (33). Darüberhinaus kann bis zu 5 % des applizierten Fibrinogens adsorbiert werden und erscheint im Eluat unter Peak II (21).

Ein weiteres Problem der Adsorptionschromatografie liegt darin, daß fixiertes Fibrinogen in Lösung gehen kann und so die Meßwerte verfälscht, in der Weise, daß ursprünglich fixiertes Fibrinogen und LFMK unter Peak B eluiert wird und der gemessene Wert zu hoch liegt. Untersuchungen zu diesem Problem mit Sepharose-fixiertem, radioaktiv markiertem Fibrinogen zeigten, daß pro Lauf 0,011 % der Radioaktivität in Peak A und 0,016 % in Peak B erscheint (28). Ein Auftreten derart geringer Mengen kann vernachlässigt werden. Die Prüfung der Haltbarkeit der Fibrinogen-

Sephrose ergab, daß erst nach 25 Chromatografie-Läufen oder 10 Tagen die Elution des fixierten Materials ansteigt (28). Im vorliegenden Experiment wurde nach jeweils fünf Läufen ein Probelauf eingeschaltet, um zu eruieren, ob Säulenfibrinogen ausgewaschen wird. Fiel der Test von Peak-B-Eluat auf Fibrinogenderivate positiv aus, so wurde die entsprechende Säule mit frischer Fibrinogen-Sephrose gefüllt und nochmals getestet.

Bei der quantitativen Untersuchung mit radiaktiv markiertem Fibrin (28) zeigte sich, daß unabhängig von der Menge des applizierten Fibrins jeweils 25 % der Radiaktivität in Peak A eluiert wird und 75 % in Peak B. Daraus muß man schließen, daß 25 % der Fibrinmonomere in Peak A eluiert werden und somit der quantitativen Bestimmung entgehen. Die Ursache für diesen Befund kann darin liegen, daß die Adsorption von Fibrinmonomer an Fibrinogen eine Gleichgewichtsreaktion ist. Folglich wäre die Menge des adsorbierten Fibrinmonomers abhängig vom Verhältnis der Mengen von fixiertem Fibrinogen zu gelöstem Fibrinogen in der Säule sowie vom Reaktionsmilieu. Die Reaktionskinetik ist jedoch im einzelnen noch nicht erforscht.

Bei der Beurteilung von Selektivität und Spezifität der

Adsorptionschromatografie bei der Bestimmung der LFMK kann man feststellen, daß die Methode eine hohe Spezifität für Fibrinmonomere aufweist und daß unter konstanten Versuchsbedingungen ein konstanter Prozentsatz des Fibrinmonomers, 75 %, im Volumen von Peak B eluiert wird.

3. Genauigkeit der quantitativen Bestimmungsmethoden

a) Planimetrie

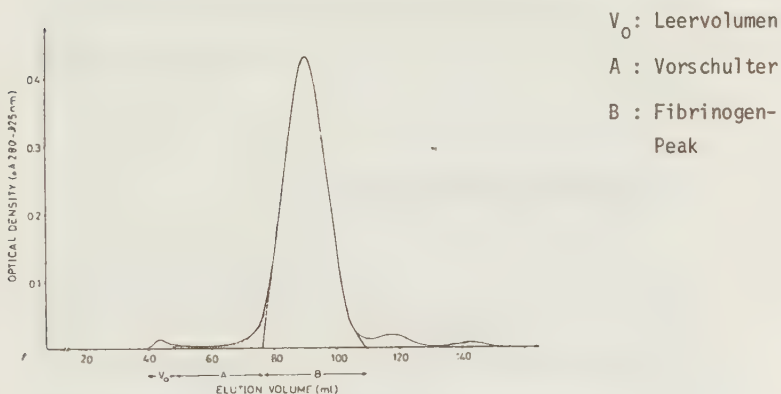


Abb. 5: Elutionsmuster bei Gelfiltration von Plasma, ausgefällt mit β -Alanin.

Auf die Trennung der LFMK von Fibrinogen durch Ararose-Gelfiltration folgt die quantitative Bestimmung der LFMK. Im Extinktionsdiagramm (Abb. 5) werden sie LFMK durch die Vorschulter vor dem Fibrinogen-Peak repräsentiert (9). Die Ab-

grenzung der Vorschulter vom Fibrinogen-Peak erfolgt durch Verlängerung des ansteigenden Schenkels des Fibrinogen-Peaks bis zur Abszisse. Diese Linie ist insofern problematisch, als der Übergang von der LFMK-Fraktion zur Fibrinogen-Fraktion kontinuierlich ist und somit eine Zone existiert, in der sowohl LFMK als auch Fibrinogen nachweisbar sind. Der Fehler wird aber teilweise wieder ausgeglichen, da sowohl LFMK im Fibrinogen-Bereich, wie auch Fibrinogen im Bereich der Vorschulter vorkommen.

Mit der hier angewandten Methode der Extinktionsmessung, kombiniert mit Planimetrie werden sehr gute Näherungswerte erzielt.

b) Staphylokokken-Clumping-Test

Nach Isolierung der LFMK von den anderen Plasmaproteinen durch Adsorptionschromatografie wurden die LFMK mit Hilfe des Staphylokokken-Clumping-Tests (SCT) quantitativ bestimmt. Nach Lipinski und Hawiger (25) ist der SCT empfindlich für Fibrinogen, Fibrinmonomer, LFMK sowie für frühe Abbauprodukte des Fibrinogens und Fibrins, die bei Plasminolyse entstehen. Von diesen Substanzen kommen im Eluat von Peak B lediglich Fibrinmonomer und geringe Anteile (bis 5 %) Fibrinogen vor. Andere Proteine treten im Peak-B-Eluat nicht auf,

außer Kälte-unlösliches Globulin und das wird durch den SCT nicht erfaßt.

Die Empfindlichkeit des verwendeten Staphylokokkenansatzes lag bei einer Fibrinogenkonzentration von 25 µg/ml. Für LFMK wurde dieselbe Empfindlichkeit angenommen. Die Verdünnungsreihe erfolgte von Stufe zu Stufe jeweils im Verhältnis von 1 : 2. Eine positive Reaktion des SCT entsprach also eine LFMK-Konzentration von 2,25; 4,5; 9,0; 18,0 oder 36,0 mg/100 ml Plasma. Da es sich bei der Verklumpungsreaktion um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt und deshalb die Stärke der Verklumpung im ersten Verdünnungsschritt nicht weiter quantitativ differenziert werden kann, wurde die Methode der Verdünnungsreihe gewählt. Auch hierbei muß man in Kauf nehmen, daß die Konzentrationen, die zwischen den bestimmaren Konzentrationen der Verdünnungsstufen liegen, nicht mehr bestimmbar sind. Eine kontinuierliche Messung mit einer stetigen Verteilung der Meßwerte ist mit dieser Methode nicht möglich; es liegt vielmehr eine diskrete Verteilung der Meßwerte vor. Die, bei der Adsorptionschromatografie festgestellte größere Varianz der Meßwerte ist der Meßmethode des SCT zuzuschreiben, die lediglich ein relativ grobes Raster an Meßwerten erfaßt, da sich die Unterschiede der Konzentra-

tionen von Stufe zu Stufe verdoppeln.

4. Temperaturabhängigkeit bei Adsorptionschromatografie und Gelfiltration

Die Adsorptionschromatografie wurde zunächst bei ca. 30°C Raumtemperatur durchgeführt. Im Peak-B-Eluat konnte mit Hilfe des SCT kein Fibrinogen-ähnliches Protein nachgewiesen werden. Bei der vorhergehenden Untersuchung dieser Plasmen mittels Gelfiltration war jedoch gezeigt worden, daß die Plasmaproben LFMK enthalten. Die Chromatografie-Läufe fanden fortan bei +4°C statt.

Nachfolgende Untersuchungen der Temperaturproblematik zeigen, daß die LFMK einer temperaturabhängigen Dissoziation unterliegen (16, 26, 29). Mit steigender Temperatur nimmt der Dissoziationsgrad der Fibrinogen-Fibrinmonomer-Komplexe zu, wobei in dem Temperaturbereich zwischen 12°C und 37°C ein linearer Zusammenhang zwischen Temperatur und Dissoziationsgrad der LFMK besteht.

Das Phänomen der Nicht-Adsorption läßt sich demzufolge so erklären, daß bei 30°C die Affinität von Fibrinmonomeren zu Fibrinogen verringert ist und deshalb auch keine Adsorption der Fibrinmonomere an Sepharose-fixiertes Fibrinogen

stattfindet (24, 27). Die Fibrinmonomere wurden wahrscheinlich zusammen mit dem Fibrinogen im Peak A eluiert und können im Peak B nicht nachgewiesen werden.

5. Auftreten von Fibrinpolymeren mit hohem Molekulargewicht

Im Stadium der Hyperkoagulabilität treten nicht nur Fibrinogen-Fibrin-Dimere auf, sondern auch lösliche Fibrinpolymere mit hohem Molekulargewicht (13).

Sie entstehen in vitro durch Inkubation von Fibrinogen mit Thrombin, aktiviertem Faktor XIII, Calcium-Ionen und Cystein. Diese Polymere werden bei Agarose-Gelfiltration hauptsächlich im Leervolumen vor der Vorschulter, aber auch zum Teil in der Vorschulter eluiert (22). Der im Leervolumen enthaltene Anteil entgeht somit der quantitativen Bestimmung der LFMK bei der Gelfiltration.

Die Fibrinpolymere bilden schlechter Komplexe mit Fibrinogen, wohl aber mit Fibrinmonomeren (22). Bei der Adsorptionschromatografie mit Sepharose-fixiertem Fibrinogen werden die Polymere folglich geringfügig adsorbiert und treten im Eluat von Peak B in kleiner Konzentration auf. Da sie aber Komplexe mit Fibrinmonomeren bilden, sind sie möglicherweise mit dafür verantwortlich, daß ca. 25 % der Fibrinmonomere nicht adsorbiert werden, zusammen mit Fibrinogen in

Peak A eluiert werden und so der quantitativen Bestimmung entgehen.

6. Schlußbemerkung

In dieser Arbeit wurden zwei Meßmethoden zur quantitativen Bestimmung der LFMK einer vergleichenden Untersuchung unterzogen. Abschließend kann dazu festgestellt werden:

- Die Adsorptionschromatografie ist die leistungsfähigere Trennmethode. Die Fibrinmonomere werden durch Adsorptionschromatografie exakter von den übrigen Plasmaproteinen getrennt.
- Die quantitative Bestimmung der isolierten LFMK bzw. Fibrinmonomere erfolgt durch Planimetrie und Messung der optischen Dichte genauer als durch den Staphylokokken-Clumping-Test, da dieser nur eine relativ grob gerasterte Annäherung an die tatsächlichen LFMK-Werte erlaubt, während bei ersterer Methode eine stetige Verteilung der Meßwerte vorliegt.
- Bei beiden Bestimmungsmethoden für LFMK muß großer Wert auf standardisierte Temperaturbedingungen gelegt werden.
- Die Bestimmung der LFMK wird beeinträchtigt durch die Wechselwirkung zwischen LFMK und höher polymeren löslichen Fibrinmonomeren.

E. Zusammenfassung

Ziel dieser Studie ist die vergleichende Betrachtung zweier Meßmethoden zur Bestimmung der löslichen Fibrin-monomer-Komplexe (LFMK) im Blutplasma.

Bei 81 Plasmaproben von Patientinnen, die sich im Stadium der Hyperkoagulabilität befanden, wurden LFMK sowohl mit Agarose-Gelfiltration als auch durch Adsorptionschromatografie isoliert und dann quantitativ bestimmt. Dies erfolgte bei ersterer Methode mittels Planimetrie, bei letzterer mit Hilfe des Staphylokokken-Clumping-Tests.

Ergebnisse:

1. Die durch Adsorptionschromatografie erhaltenen Werte liegen um ca. 50 % niedriger, als die mittels Agarose-Gelfiltration ermittelten.
2. Bei der statistischen Auswertung zeigt sich, daß die, jeweils durch Agarose-Gelfiltration sowie durch Adsorptionschromatografie ermittelten Wertereihen statistisch nicht derselben Grundgesamtheit angehören.
3. Bei der Auswertung der intraindividuellen Verläufe (drei zeitlich auseinanderliegende Plasmaproben pro Person) zeigt sich statistisch eine Obereinstimmung der Verläufe.

4. Daraus kann man schließen, daß bei einer der Methoden ein personenabhängiger zusätzlicher Faktor mitgemessen wird.
5. Bei $+4^{\circ}\text{C}$ werden LFMK an sepharose-fixiertes Fibrinogen-adsorbiert, nicht jedoch bei $+30^{\circ}\text{C}$. Daraus kann geschlossen werden, daß die Adsorptionsreaktion temperaturabhängig ist.

F. Literatur

- (1) Axen, R., Ernback, S.
Chemical fixation of enzymes to cyanogen halide
activated polysaccharide carriers.
Eur. J. Biochem. 18, 354, 1971
- (2) Blombäck, B./Blombäck, M.
Purification of human and bovine fibrinogen.
Arkiv kemi 10, 415 - 433, 1956
- (3) Blombäck, B./Hessel, B./Hogg, D./Therkildsen, L.
A two-step fibrinogen-fibrin transition in blood coagulation.
Nature, Vol. 275, 501, 1978
- (4) Chandra, R.K./Malkari, P.K./Bhasin, K.
Serum levels of α_2 -macroglobulin and JgG and ergofibrino-
genemia in Pregnancy.
Obstet and Gynec. 41, 56, 1973
- (5) Duckert, F.
Einige Aspekte der Biochemie der Blutgerinnung.
Chemie in unserer Zeit 9. Jhg. Nr. 1, 1 - 9, 1975
- (6) Fletcher, A.D./Alkjaersig, N./O'Brien, J.
Blood hypercoagulability and thrombosis.
Abstract Volume, XIII. Int. Congr. of Haematology, Munich
2. - 8. August 1970, 244

- (7) Glasshauser, R.
Thromboembolieprophylaxe mit niedrig dosiertem
Heparin nach Kaiserschnitt unter Kontrolle der
Hyperkoagulabilität im Wochenbett, gemessen am
Plasmaspiegel von löslichen Fibrinmonomerkomplexen.
Diss., 1. Frauenklinik der Universität München, 1977
- (8) Godal, H.C./Abildgaard, U.
Gelation of soluble fibrin in plasma by ethanol.
Scand. J. Haematol. 3, 342, 1966
- (9) Graeff, H./v. Hugo, R.
Identification of fibrinogen derivatives in plasma
samples.
Thrombos. diath. haemorrh. 27, 610, 1972
- (10) Graeff, H./v. Hugo, R./Hafter, R.
In vivo formation of soluble fibrin monomer complexes
in human plasma.
Thrombos. res. 3, 465, 1973
- (11) Graeff, H./v. Hugo, R.
Fibrinogen derivatives in a case of abruptio placentae.
Amer. J. Obstet. Gynecol. 120, 335, 1974
- (12) Graeff, H./Wiedemann, A./v. Hugo, R./Hafter, R.
Amount and distribution pattern of soluble fibrin monomer
complexes during the early puerperium.
Amer. J. Obstet. Gynecol. 124, 21, 1976

- (13) Hafter, R./Graeff, H.

Molecular aspects of defibrination in a reptilase treated case of "dead fetus syndrome".

Thromb. Res. 7, 391, 1975

- (14) Hafter, R./Schneebauer, T./Tafel, K./Ernst, E./
Graeff, H.

Bestimmung von löslichen Fibrinmonomerkomplexen zur Erfassung der Hyperkoagulabilität in der Schwangerschaft und unter der Geburt.

Geburtsh. u. Frauenheilk. 35, 518, 1975

- (15) Hafter, R./Graeff, H.

Estimation of soluble fibrin monomer complexes by agarose gel filtration.

Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis,
Vol. 2, Raven Press, New York, 1976, S. 137

- (16) Hafter, R./v. Hugo, R./Baumgärtner, M./Hiller, K.F./
Graeff, H.

Temperature dependent dissociation of soluble fibrin monomer complexes demonstrated by agarose gel filtration.

Thrombos. Res. 10, 325, 1980

- (17) Hawiger, J./Niewiarowsky, S./Gurewich, V./Thomas, D.P.

Measurement of fibrinogen and fibrin degradation products in serum by staphylococcal clumping test.

J. Lab. Clin. Med. Vol. 75, No. 1, 93, 1970

- (18) Heene, D.L./Matthias, F.R.
Adsorption of fibrinogen derivatives on insolubilized
fibrinogen and fibrin monomer.
Thrombos. Res. Vol. 2, 137, 1973
- (19) Hörmann, H./Gollwitzer, R.
Analytische Untersuchungen über Rinderfibrinogen und -fibrin.
Z. Physiolog. Chemie 346, 21, 1966
- (20) v. Hugo, R./Graeff, H.
Formation of soluble fibrin monomer complexes in human
plasma.
Thrombos. Res. 3, 183, 1973
- (21) v. Hugo, R./Hafter, R./Stemberger, A./Graeff, H.
Soluble fibrin monomer complexes demonstrated by agarose
gel filtration and by adsorption on insolubilized fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 34, 216, 1975
- (22) v. Hugo, R./Hafter, R./Stemberger, A./Graeff, H.
Complex formation of crosslinked fibrin oligomers with
agarose-coupled fibrinogen and fibrin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chemie, 358, 1359, 1977
- (23) Kitzmiller, J.L./Lang, J.E./Yelenosky, P.F./Lucas, W.E.
Hematologic assays in preeclampsia.
Amer. J. Obstet Gynecol. 118, 362, 1974
- (24) Krell, W./Mahn, I./Müller-Berghaus, G.
Gel filtration of ^{125}I -Fibrin and ^{131}I -Fibrinogen at
20°C and 37°C.
Thromb. Res. 14, 299, 1979

- (25) Lipinski, B./Hawiger, J./Jeljaszewicz, J.
Staphylococcal clumping with soluble fibrin monomer
complexes.
J. Exp. Med. 126, 979, 1967
- (26) Mahn, I./Schönbach, F./Müller-Berghaus, G.
Formation and dissociation of soluble fibrin in
vivo.
Thromb. Res. 11, 67, 1977
- (27) Mahn, I./Krell, W./Müller-Berghaus, G.
Separation of human des-AB-fibrin and fibrinogen by
sepharose-plasma chromatography at 20°C and 37°C.
Thromb. Res. 14, 651, 1979
- (28) Matthias, F.R./Reinicke, R./Heene, D.L.
Affinity chromatography and quantitation of soluble
fibrin from plasma.
Thromb. Res. 10, 365, 1977
- (29) Müller-Berghaus, G./Mahn, I./Krell, W.
Formation and dissociation of soluble fibrin complexes
in plasma at 20°C and 37°C.
Thromb. Res. 14, 561, 1979
- (30) Niewiarowski, S./Gurewich, V.
Laboratory identification of intravascular coagulation.
The serial dilution protamine sulfate test for the de-
tection of fibrin monomer and fibrin degradation products.
J. Lab. Clin. Med. 77, 665, 1971

- (31) Semeraro, N./Collen, D.

Affinity chromatography of soluble fibrin in human plasma on insolubilized fibrinogen and fragment D.
Thromb. Res. 12, 1059, 1978

- (32) Stemberger, A./Hörmann, H.

Heterogeneity of clottable fibrinogen isolated from plasma by affinity chromatography.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 341, 1975

- (33) Stemberger, A./Hörmann, H.

Affinity chromatography on immobilized fibrinogen and fibrin monomer, II. The behavior of cold-insoluble globulin.
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 1003, 1976

- (34) Straughn, W./Wagner, R.H.

A simple method for preparing fibrinogen.
Thromb. Diath. Haemorrh. 16, 197, 1966

- (35) Überla, K.

Biomathematik, Erläuterungen und Lernhilfen,
Institut für medizinische Informationsverarbeitung,
Statistik und Biomathematik der Universität München, 1975

- (36) Witt, I.

Biochemie der Blutgerinnung und Fibrinolyse.
Verlag Chemie

- (37) Sehligsohn, U./Rapaport, S.J./Kuefler, P.R.

Extraadrenal effects of ACTH on fibrinogen synthesis.

Am. J. Physiol. 224, 1172, 1973

- (38) Ströder, W./Hörmann, H.

The cold insoluble fibrinogen fraction of bovine and human plasma.

Biochem. Biophys. Acta, 351, 396, 1974

LEBENS LAUF

Am 22. Januar 1953 wurde ich als Sohn des Augenoptikermeisters Gottfried Melcher und seiner Ehefrau Margarethe, geborene Schmidt, in Bautzen geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule in Betzenstein/Oberfranken ging ich von 1963 bis 1967 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium Pegnitz/Ofr. und von 1967 bis 1972 in das Goethe-Gymnasium in Regensburg. 1972 legte ich dort mit Erfolg das Abitur ab. Danach arbeitete ich von Oktober 1972 bis März 1973 im Rahmen des Freiwilligen Sozialen Jahres als Krankenpflegehelfer in der Klinik des Wichernhauses in Altdorf bei Nürnberg.

Im Sommersemester 1973 begann ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig Maximilians-Universität in München.

Im März 1975 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, und im November 1979 bestand ich das Staatsexamen.

Im Februar 1980 wurde ich zur Bundeswehr eingezogen und leistete den Wehrdienst als Stabsarzt bis April 1981.

gez. Thomas Melcher

Herzlich danken möchte ich

Herrn Prof. Dr. Graeff für die Überlassung der Arbeit. Zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. von Hugo, Herrn Dr. Hafter und Herrn Dr. Stemberger für die Unterstützung bei der Durchführung.

